



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

**The ecology and evolution of microbial warfare in streptomyces**  
Westhoff, S.

**Citation**

Westhoff, S. (2021, January 13). *The ecology and evolution of microbial warfare in streptomyces*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/139045>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/139045>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden

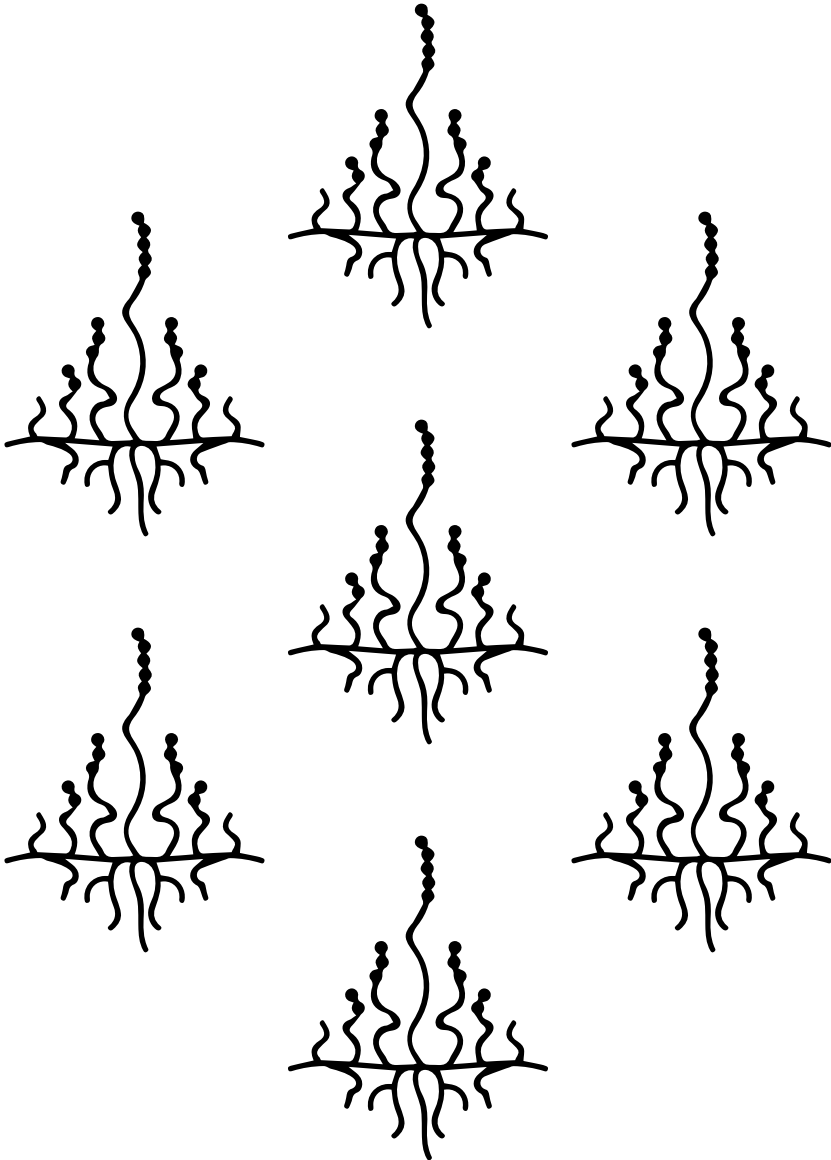


The handle <http://hdl.handle.net/1887/139045> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Westhoff, S.

**Title:** The ecology and evolution of microbial warfare in streptomyces

**Issue Date:** 2021-01-23



# Chapter 7.2

Nederlandse samenvatting

Sinds de ontdekking van penicilline door Fleming in 1928 zijn antibiotica een krachtig wapen in ons gevecht tegen bacteriële infecties. Door de toename van antibioticumresistentie in pathogene bacteriën zijn er echter steeds minder antibiotica beschikbaar om infecties te behandelen, waardoor de noodzaak ontstaat om nieuwe antibiotica te vinden. Het ontdekken en ontwikkelen van nieuwe antibiotica is een enorme uitdaging, voor een belangrijk deel door de herontdekking van al bekende stoffen (Baltz, 2007). Door de nadruk op het zoeken naar nieuwe actieve stoffen en resistentiemechanismen is er minder aandacht voor de rol die antibiotica en antibioticumresistentie spelen voor de natuurlijke producenten. We bestuderen de farmacokinetiek en –dynamiek van behandelingen van patiënten met antibiotica, maar we weten heel weinig over die soortgelijke dynamiek in de natuurlijke omgeving. En terwijl we bezorgd het ontstaan van resistente bacteriën afwachten in de kliniek, geven we veel minder aandacht aan de wijdverbreide natuurlijke resistentie. En dat terwijl antibiotica resistentie zelfs te vinden is in ongerepte gebieden waar geen mens is geweest, zoals blijkt uit onderzoek naar bacterieel DNA van miljoenen jaren oud geïsoleerd uit ijskernen. Ook al is het nu bijna een eeuw geleden dat Fleming het eerste antibioticum ontdekte, toch zijn wij mensen een nieuwe speler op het gebied van bacteriële oorlogsvoering. Daartegenover ontwikkelen bacteriën al miljarden jaren antibiotica om elkaar te bestrijden en tevens manieren om zich hiertegen te wapenen. Het doel van dit proefschrift is om de ecologie en evolutie van deze bacteriële oorlogsvoering te begrijpen.

Het werk in dit proefschrift richt zich op bacteriën van het genus *Streptomyces*. Deze bacteriën zijn zeer geschikt om vragen omtrent bacteriële oorlogsvoering mee te beantwoorden, omdat ze gedurende hun evolutie een grote verscheidenheid aan genclusters voor bioactieve natuurstoffen hebben ontwikkeld die ons hebben voorzien van de helft van de antibiotica die wij op dit moment gebruiken in de kliniek (Barka *et al.*, 2016). Naast de grote hoeveelheid antimicrobiële en anti-kanker stoffen die al bekend zijn in dit genus laten genomesequenties ook een verrassende rijkdom aan nieuwe natuurlijke producten zien die nog ontdekt kunnen worden. Streptomyceten en andere sporenvormende Actinobacteriën hebben een gecompliceerde levenscyclus, die anders is dan die van alle andere bacteriën. Een ontkiemende spore vormt een multicellulair netwerk van hyphen dat we kennen als een vegetatief mycelium en doet denken aan dat van filamenteuze schimmels. Ten tijde van stress, zoals een gebrek aan nutriënten, wordt een ontwikkelingsproces in gang gezet dat er toe leidt dat hyphen de lucht in groeien om een nieuwe generatie sporen te produceren. Gedurende dit proces zijn ze in staat om een brede variëteit aan secundaire of gespecialiseerde metabolieten te

produceren, waaronder antibiotica, sideroforen, pigmenten en quorum sensing moleculen. Het lineaire chromosoom codeert voor een zeer groot aantal regulatoren die, naast het reguleren van de complexe levenscyclus, ook betrokken zijn bij het coördineren van de productie van de vele gespecialiseerde metabolieten in reactie op stimuli uit de omgeving. Sinds de ontdekking van het antibioticum streptomycine in het lab van Selman Waksman in 1944 zijn veel aspecten van de *Streptomyces* biologie in detail bestudeerd, zoals hun ontwikkeling, antibioticumproductie en regulatoire netwerken (Chater, 2016). Dit proefschrift richt zich op de rol van antibiotica en antibioticumresistentie voor de producerende bacteriën gedurende microbiële competitie. Dit werk geeft inzichten in de voordelen van antibioticumproductie tijdens competitie, maar leidt vanzelfsprekend ook weer tot nieuwe vragen en hypothesen, waarvan een aantal hier besproken zullen worden.

Omdat nagenoeg alle studies aan streptomyceten in het laboratorium gedaan worden, groeien deze bacteriën onder kunstmatige condities op voedingsbodem of in erlenmeyers vol voedingsstoffen, waardoor ze in hoeveelheden en met snelheden groeien die we in de natuur niet zouden verwachten. Onder deze omstandigheden produceren ze veel antibiotica die de concentraties benaderen die doktoren hun patiënten voorschrijven om bacteriële infecties te behandelen. Door de focus op het medische aspect van antibiotica, is men er vaak van overtuigd dat antibiotica alleen nuttig zijn in concentraties waarbij ze bacteriën doden of de groei volledig verhinderen. Omdat zulke concentraties niet gevonden worden in de natuurlijke omgeving zoals in de bodem, wordt er vaak gesteld dat antibiotica niet als wapens gebruikt kunnen worden door hun natuurlijke producent. In **Hoofdstuk 3** van dit proefschrift worden de voordelen van streptomycine-resistentie voor *Streptomyces coelicolor* bestudeerd onder niet-dodelijke concentraties van dit antibioticum, dat in de natuur geproduceerd wordt door andere *Streptomyces* soorten. De resultaten die worden beschreven in dit hoofdstuk laten, samen met andere studies, zien dat antibioticumresistentie al nuttig is voor bacteriën bij niet-dodelijke concentraties (Gullberg *et al.*, 2011, 2014). Zelfs wanneer deze resistentie kosten met zich meebrengt in de afwezigheid van antibiotica, zijn lage concentraties antibiotica al genoeg om de fitness van een niet-resistente bacterie zo ver te verlagen dat een resistente bacterie hier voordeel van heeft. Dit is een belangrijk punt om te overwegen wanneer we proberen te begrijpen hoe bacteriële oorlogsvoering in zijn werk gaat. Het laat zien dat bacteriën niet alleen een gevecht kunnen winnen door voor de knock-out te gaan, maar ook door een tegenstander simpelweg genoeg te verwonden om zijn groei te vertragen. Lage concentraties antibiotica worden niet alleen gevonden in de natuurlijke omgeving waar ze worden geproduceerd door de

aanwezige microflora. Ze worden ook gecreëerd tijdens een antibioticakuur in bepaalde delen van het lichaam van een patiënt of door het gebruik van antibiotica in veevoer om de veeteelt te verbeteren, waardoor antibiotica in de omgeving terecht komen. Op de langere termijn laten de resultaten in **Hoofdstuk 3** zien dat blootstelling aan een lage concentratie antibiotica genoeg is om resistentie te evolueren en zelfs te fixeren in een populatie. Dit kan verklaren waarom we antibioticumresistente bacteriën vinden in ongerepte gebieden waar de menselijke invloed beperkt is.

Ondanks dat wordt aangenomen dat de concentratie antibiotica in de grond laag is, weten we niet wat de lokale concentratie van deze moleculen is. In feite weten we vrij weinig van de ruimtelijke structuur van bacteriën in hun natuurlijke omgeving. Schattingen van de bacteriële dichtheid in de bodem komen uit op  $10^{10}$  cellen per gram grond en op zo'n  $10^4$  verschillende soorten (Roesch *et al.*, 2007; Torsvik *et al.*, 1990). Bacteriën gaan alleen interacties aan met een handvol andere individuen doordat de gemiddelde afstand tussen cellen in de bodem zo'n 12  $\mu\text{m}$  is, wat resulteert in gemeenschappen van rond de 100 soorten (Raynaud and Nunan, 2014). De bodem is een heterogene omgeving met lokale hotspots vol voedingstoffen. De rhizosfeer, die rijk is aan suikerrijke exudaten die uit plantenwortels lekken, is zo'n omgeving waar soorten specifiek kunnen worden gerekruteerd door planten voor gunstige functies. Andere voedingsrijke omgevingen kunnen ontstaan door ontbindende planten, dieren, insecten of schimmels. Bacteriën hebben verschillende manieren ontwikkeld om voedingstoffen te lokaliseren en zich hieraan te hechten, zoals chemotaxis, verschillende vormen van mobiliteit en de vorming van biofilms. De productie van toxische stoffen kan worden gebruikt om voedingsbronnen te verdedigen of juist om een gevestigde gemeenschap binnen te dringen. Op deze lokale schaal kunnen de concentraties antibiotica die geproduceerd worden, zeker in de nabijheid van een kolonie, hoog zijn door de ruimtelijke structuur van de grond. In **Hoofdstuk 4** wordt de rol van deze ruimtelijke structuur bij de productie van antibiotica beschreven en de data laten zien dat de ruimtelijke structuur de drempel voor invasie verlaagt voor een antibiotica producerende stam. Dit komt, zoals ook is bewezen voor *E. coli* toxines genaamd colicins, door de preferentiële allocatie van de vrijgemaakte voedingsstoffen aan de antibioticaproductent (Chao and Levin, 1981). Zonder de ruimtelijke structuur worden de vrijgemaakte voedingsstoffen verdeeld over de producent en de gevoelige soort, waardoor de producent wel de kosten van antibioticaproductie moet dragen maar geen recht evenredig voordeel krijgt ten opzichte van de gevoelige stam. Lokale concentraties

van antibiotica zouden om deze reden af kunnen wijken van de gemiddelde concentraties in de grond en zijn veel relevanter vanuit het oogpunt van een bacterie.

Om het functioneren van microbiële gemeenschappen beter te begrijpen is het van belang niet alleen onderzoek te doen naar de diversiteit van de soorten in deze gemeenschappen en hun ruimtelijke structuur, maar ook naar de afstand die moleculen zoals antibiotica afleggen. Een hypothese over de afstand die verschillende signalen en wapens afleggen is beschreven in **Hoofdstuk 2**. Deze hypothese stelt dat stoffen geproduceerd door bacteriën verschillende afstanden af kunnen leggen afhankelijk van hun eigenschappen en daardoor informatie zouden kunnen bevatten over de afstand waarop een tegenstander zich bevindt. In dit hoofdstuk worden drie verschillende afstanden gedefinieerd: vluchtige stoffen met laag moleculair gewicht die door luchtbelletjes kunnen diffunderen; diffundeerbare stoffen zoals antibiotica die over een kortere afstand kunnen diffunderen; en contactafhankelijke inhibitie zoals het type VI secretie systeem waarvoor contact tussen cellen nodig is. Een review van de literatuur onthulde dat vluchtige stoffen vooral verdedigende reacties ontlokken zoals resistentie, terwijl diffundeerbare stoffen en contactafhankelijke inhibitie een onmiddellijke tegenaanval opwekken.

Hoewel de kosten van antibioticumproductie voor streptomyceten niet gekwantificeerd zijn, is het aannemelijk dat het produceren van antibiotica metabolische kosten met zich mee brengt door de vereisten aan materialen en eiwitten die benodigd zijn voor de productie van deze ingewikkelde stoffen. De genclusters die coderen voor de eiwitten die nodig zijn voor de productie van deze kostbare metabolieten zijn daarom strikt gereguleerd. *Streptomyces* genomen coderen voor een zeer grote hoeveelheid regulatoren: voor het modelorganisme *S. coelicolor* is voorspeld dat 12% van de open reading frames codeert voor regulatoire eiwitten (Bentley *et al.*, 2002). Van veel regulatoren is bekend dat ze betrokken zijn bij de regulatie van de ontwikkeling of de reactie op nutriëntenlimitatie, pH of zoutstress, maar de signalen voor vele anderen blijven onbekend. Het is waarschijnlijk dat er regulatoren zijn die reageren op de aanwezigheid van tegenstanders en vervolgens de productie van antibiotica reguleren om de groei van deze tegenstanders te verhinderen. Genoomsequenties hebben onthuld dat actinomyceten veel meer potentieel hebben om bioactieve stoffen te produceren dan origineel was gedacht (Nett *et al.*, 2009). Er zijn verschillende studies die aantonen dat streptomyceten reageren op competitie door hun antibioticumproductie aan te passen. Het grootste deel van deze literatuur beschrijft een toename in antibioticumproductie in reactie op andere bacteriën. Dit is mogelijk vertekend door de zoektocht naar nieuwe antimicrobiële



stoffen die kunnen worden toegepast in de geneeskunde (Rutledge and Challis, 2015; Zhu *et al.*, 2014). Het was echter onduidelijk waarom *Streptomyces* soorten reageren op de aanwezigheid van het ene micro-organisme door hun antibioticumproductie te veranderen, maar niet op het andere. Welke signalen liggen ten grondslag aan deze reactie? In **Hoofdstuk 5** proberen we een antwoord te geven op deze vraag. De conclusie uit de experimenten is dat de kans op inductie van antibioticumproductie groter is in reactie op stammen die fylogenetisch dicht verwant zijn of overeenkomstige secundaire metaboliet clusters hebben. Dit impliceert dat stammen op elkaar zouden kunnen reageren door dezelfde signalen te gebruiken of elkaars signalen af te luisteren. Verrassend genoeg leidt competitie ook vaak tot het onderdrukken van de antibioticumproductie. We kunnen op dit moment alleen speculeren over het mechanisme dat hieraan ten grondslag ligt aangezien we geen associatie vonden tussen de onderdrukking van antibioticaproduktie en fylogenetische afstand, gedeelde secundaire metabolische clusters of groei inhibitie door de competitie. Het beperken van de hoeveelheid voedingsstoffen leidde tot een toename van het aantal interacties waarbij de antibioticumproductie werd onderdrukt. In de afwezigheid van competitie vonden we geen vergelijkbare afname van de antibioticaproduktie. Dit suggereert dat informatie van verschillende omgevingscondities wordt gebruikt in het besluitvormingsproces.

Stammen met overeenkomstige secundaire metabolische clusters een grotere kans hebben op de inductie van antibioticumproductie tijdens een co-cultuur (**Hoofdstuk 5**). Ook al kan deze studie niet onthullen welke exacte signalen ten grondslag liggen aan de inductie van antibioticumproductie, de link met de gedeelde secundaire metabolische clusters impliceert wel een aantal mogelijkheden. Ten eerste kunnen gedeelde clusters een aanwijzing zijn voor de productie van dezelfde secundaire metabolieten, waaronder antibiotica. Antibiotica zijn onderdeel van een feedbackmechanisme, waarbij ze hun eigen productie reguleren en de aanwezigheid van het antibioticum in de omgeving kan leiden tot een toename van de productie (Liu *et al.*, 2013). De aanwezigheid van een exogeen antibioticum dat gelijk is aan een endogeen antibioticum kan daardoor deel uit maken van deze feedback cirkel en de antibioticumproductie van een stam verhogen. Een tweede manier waarop exogene antibiotica de antibioticaproduktie kunnen stimuleren is door de binding van een zogenaamde pseudo gamma-butyrolactone receptor (Zhu *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2010). Gamma-butyrolactonen zijn quorum sensing moleculen in *Streptomyces* die de productie van antibiotica kunnen reguleren. De meeste soorten hebben een gamma-butyrolactone receptor waarmee ze hun endogene gamma-butyrolactone binden, maar bezitten daarnaast ook een tweede receptor die niet kan

binden aan hun eigen gamma-butyrolactone. Van verschillende pseudo gamma-butyrolactone receptoren is aangetoond dat ze kunnen reageren op exogene antibiotica en dat deze de antibioticumproductie stimuleren. Sommige soorten produceren gamma-butyrolactonen met vergelijkbare structuren, waardoor ze de antibioticumproductie in elkaar kunnen verhogen (Zou *et al.*, 2014). De aanwezigheid van pseudo gamma-butyrolactone receptoren die geen endogene signalen kunnen binden in veel soorten zou kunnen suggereren dat deze worden gebruikt voor het binden van andere signalen, zoals antibiotica of mogelijk butyrolactonen met een andere structuur, om signalen van andere soorten af te luisteren en hun aanwezigheid te detecteren voordat ze schadelijke antibiotica produceren. Deze vorm van af luisteren is eerder beschreven voor bacteriocins (Miller *et al.*, 2018) en zou ook voor *Streptomyces* mogelijk kunnen zijn.

**Hoofdstuk 6** beschrijft een RNA transcriptie studie waarin de verschillen in genexpressie worden geanalyseerd tussen een *S. coelicolor* kolonie die alleen groeit en in de nabijheid van een competierende soort. De meest interessante verschillen waren een toegenomen expressie van de ontwikkelingsgenen en van de genen die coderen voor de vluchtige stoffen geosmine en 2-methylisoborneol (2-MIB). De verhoogde expressie van de ontwikkelingsgenen gedurende competitie duiden op een versnelde ontwikkeling, die vermoedelijk leidt tot een eerdere sporulatie en mogelijk tot een toename van de sporenproductie. De vluchtige organische stoffen geosmine en 2-MIB zijn verantwoordelijk voor de wat mufte geur die streptomyceten gewoonlijk produceren, die vergelijkbaar is met die van vochtige aarde. Genen voor de productie van deze stoffen zijn wijdverspreid in het genus. Bijna alle *Streptomyces* soorten bezitten een geosmine synthase gen en de helft bezit een 2-MIB synthase gen, maar de regulatie en functie waren tot voor kort onbekend. Fruitvliegjes vermijden de geur van geosmine, maar springstaarten worden juist aangetrokken door geosmine en in mindere mate 2-MIB. Geosmine en 2-MIB transcriptie worden gereguleerd door BldM en WhiH, regulatoren betrokken bij het ontwikkelingsproces, waardoor de productie van deze vluchtige stoffen en sporen gelinkt zijn. Daardoor kunnen springstaarten aangetrokken worden door deze geurtjes om de sporen te verspreiden, zowel doordat deze aan hun lichaam blijven plakken als via voeding en ontlasting. Meer onderzoek is nodig om te begrijpen of de verhoogde expressie van de geosmine en 2-MIB synthases gedurende de cultuur toe te schrijven is aan alleen de co-regulatie van deze vluchtige stoffen met sporulatie of dat geosmine en 2-MIB synthases nog meer tot expressie komen gedurende competitie als een manier om een vijandig milieu te ontvluchten. Dit roept de interessante vraag op of

streptomyceten in een competitieve omgeving het besluit kunnen nemen om niet te vechten, maar alle middelen in te zetten op het produceren van sporen en het aantrekken van geleedpotigen en insecten om naar een nieuwe en hopelijk betere omgeving te verspreiden.

Dit proefschrift biedt verschillende inzichten in de regels van bacteriële oorlogsvoering. Ten eerste toont het aan dat resistentie al voordelen biedt bij lage antibioticumconcentraties, waardoor resistentie kan ontwikkelen en fixeren in een populatie die wordt blootgesteld aan lage concentraties antibiotica (**Hoofdstuk 3**). Vervolgens laat dit proefschrift zien dat ruimtelijke structuur voordelen biedt voor antibioticumproductie doordat het de benodigde antibioticumconcentratie voor de invasie van een antibiotica producerende stam verlaagt dankzij de preferentiële allocatie van de vrijgemaakte voedingsstoffen aan de antibioticaproductent (**Hoofdstuk 4**). De biotische omgeving speelt ook een belangrijke rol in de antibioticumproductie aangezien streptomyceten de productie zowel induceren als onderdrukken in reactie op andere stammen. Inductie is het meest waarschijnlijk in reactie op stammen die fylogenetisch dicht verwant zijn of secundaire metabolische clusters delen, maar de signalen die betrokken zijn bij het onderdrukken van de antibioticumproductie blijven onbekend (**Hoofdstuk 5**). Uiteindelijk laat een RNA transcriptie studie zien dat er andere reacties op competitie zijn, zoals een verhoogde expressie van genen betrokken bij de ontwikkeling, die duiden op een vervroegde sporulatie (**Hoofdstuk 6**). Deze resultaten roepen ook nieuwe vragen op, waaronder de vraag of er andere tactieken worden toegepast in microbiële oorlogsvoering, zoals vecht-of-vluchtreactie in dieren. Hoewel deze vragen interessant zijn vanuit een fundamenteel perspectief, zal gedetailleerde kennis van het belang van antibiotica voor de natuurlijke producenten en de signalen die ze gebruiken om de productie te induceren ons ook kunnen helpen bij het vinden van nieuwe bioactieve moleculen, tactieken of doelen in ons menselijke gevecht tegen pathogene bacteriën.



